

博士論文(要約)

CLC-5 の 2Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送機能は V-ATPase を介する  
効率的エンドゾーム酸性化に必要なである

氏 名 佐藤 信彦

## 論文の内容の要旨

論文題目 CLC-5 の 2Cl/H 交換輸送機能は V-ATPase を介する効率的エンドゾーム酸性化に必要である

氏名 佐藤 信彦

Dent 病は腎近位尿細管の機能障害による低分子蛋白尿、高カルシウム尿症、腎石灰化、腎不全などを臨床的特徴とする伴性劣性の遺伝子疾患である。1964 年に英国の Dent と Friedman により報告された高カルシウム尿性くる病と近位尿細管障害を呈した 2 症例を源流とし、類似疾患である伴性劣性腎結石症 (XRN)、伴性劣性低リン性くる病 (XLRH)、本邦における特発性低分子蛋白尿症などを包含する Dent 病であるが、本邦では稀とされる腎不全が海外においては 40~50 代の男性患者の半数以上に末期腎不全として認められるなど臨床症状は様ではなくその原因も明らかにはされていない。一方、Dent 病の原因遺伝子の 1 つとして電位依存性 2Cl/H 交換輸送体 CLC-5 をコードする *CLCN5* (Xp11.22) が同定されており、Dent 病患者の半数以上で同部位に変異を認める (Dent-1)。また、約 15% ではホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 5-ホスファターゼをコードし Lowe 症候群 (眼脳腎症候群) の原因遺伝子でもある *OCRL1* の変異を認め (Dent-2)、両者いずれにも変異を有さない症例も存在する。

CLC-5 は CLC family に属する 2Cl/H<sup>+</sup>交換輸送体で、腎近位尿細管の初期エンドゾーム膜上に豊富に発現しているが、Henle の上行脚や集合管介在細胞にも分布する。近位尿細管のエンドゾーム膜において CLC-5 は液胞型プロトンポンプである V-ATPase と共に発現し、V-ATPase によるエンドゾーム内の酸性化を促進すると考えられている。実際に *CLCN5* 遺伝子をノックアウトしたマウスにおいて、エンドゾーム内の酸性化障害とエンドサイトーシスの障害を認め、Dent 病の臨床的特徴とされる低分子蛋白尿、高カルシウム尿症を呈したことから、CLC-5 は V-ATPase によりエンドゾーム内に取り込まれた H<sup>+</sup>の電荷を打ち消す Cl<sup>-</sup>シャントとして機能することで、V-ATPase によるエンドゾーム内の酸性化を促進している可能性が示唆されている (Indirect acidification model)。

しかしながら、CLC-5 の機能に関しては CLC-5 が直接的にエンドゾーム内に H<sup>+</sup>を取り込み Cl<sup>-</sup>を排出する Direct acidification model や、前述の Indirect acidification model の中でも V-ATPase の活性化がエンドゾーム内酸性化/エンドサイトーシスにとってより重要とする説 (V-ATPase activation theory)、Cl<sup>-</sup>の蓄積がより重要とする説 (Cl<sup>-</sup> accumulation theory) など諸説あり一致した見解は得られていない。中でも Cl<sup>-</sup> accumulation theory を支持する研究として E211A 人工変異体を用いたマウスの実験が知られている。E211 は "gating glutamate" と呼ばれ、Cl<sup>-</sup>輸送および H<sup>+</sup>センサーとして機能することで CLC-5 のイオン輸送に関わる重要な部位であり、E211A 人工変異体では CLC-5 は 2Cl/H 交換輸

送体としての機能を失い、純粋な Cl<sup>-</sup>チャンネルとして機能する。この E211A 人工変異体ノックインマウスにおいてはエンドサイトーシスが障害され Dent 病の臨床所見を呈するものの、エンドゾーム内の酸性化障害を認めないことから Cl<sup>-</sup> accumulation theory を支持するものであるが、150 以上同定されている *CLCN5* の変異においてこの”gating glutamate”の変異はこれまで報告されていなかった。

本研究では、典型的な Dent 病患者より同定された”gating glutamate”における E211Q 新規変異体の機能及びエンドゾーム酸性化に与える影響について wild-type CLC-5 と E211A 人工変異体と比較検討を行い、Dent 病の発症機序を明らかにする目的で実験を行った。

最初に、*Xenopus oocyte* 発現系において 2 電極膜電位固定法を用いて wild-type CLC-5 及び E211A、E211Q 変異体の Cl<sup>-</sup>電流特性の解析を行った。wild-type CLC-5 では既知の如く強い外向き整流性を示す Cl<sup>-</sup>電流を認め、E211Q では Cl<sup>-</sup>チャンネルである E211A 人工変異体と同様に、整流性のない直線的な Cl<sup>-</sup>電流を認めた。細胞外 pH の変化に対する Cl<sup>-</sup>電流の変化を観察すると、wild-type CLC-5 では pH5.4 の酸性下で約 30% の Cl<sup>-</sup>電流の減少(vs. pH7.4)を認めたのに対し、E211A と E211Q では電流の変化を認めなかった。そして、+80mV の脱分極パルスによる連続刺激を行い pH 感受性微小電極により Oocyte 細胞膜直上の局所 pH を測定したところ wild-type CLC-5 では  $0.29 \pm 0.05$  (n=4) の pH 低下を認めたが E211A (n=9) と E211Q (n=7) では pH の変化を認めなかった。これらより E211Q 新規変異体は Cl<sup>-</sup>チャンネルである E211A と同様に 2Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送機能を喪失していることがわかった。大腸菌 CLC-ec1 の X 線結晶構造解析に基づく CLC-5 の推定構造の解析によれば wild-type CLC-5 の Glu211 がプロトネートされて gate が開き”open conformation”となることで Cl<sup>-</sup>輸送が可能となるのに対して、E211A では主鎖の向きの変化により常に”open conformation”を呈し、E211Q ではプロトネートされた Glu211 を常に有するのに近い状態となることで”open conformation”を呈するために H<sup>+</sup>輸送が困難となることが予想されており、この結果とよく一致していた。

次に HEK293 細胞及び蛍光色素 (BCECF/AM; Molecular Probes)を用いた細胞内 pH 測定により V-ATPase 活性の測定を行った。NH<sub>4</sub>Cl パルスの後に Na-free 溶液で還流することで細胞内は酸性化し (pH6.8)、その後に低浸透圧性 Na<sup>+</sup>-free 溶液で還流した際に観察される Na<sup>+</sup>非依存性の pH の回復を V-ATPase の活性と想定して測定を行った。E211A ( $0.28 \pm 0.04$  pH/unit/min)、E211Q ( $0.22 \pm 0.01$  pH/unit/min)。両者で vector と比較して有意な V-ATPase の活性化を認めたが、wild-type CLC-5 ( $0.59 \pm 0.08$  pH/unit/min)で最大活性を認めた。細胞膜分画における V-ATPase B2 subunit は導入遺伝子の種類や、低浸透圧溶液還流による発現量の変化を認めず、細胞全体の CLC-5 の発現量はむしろ E211Q で多かった。これらより CLC-5 は V-ATPase を活性化し、中でも wild-type CLC-5 がその機能的最大活性化に必要であることが示唆された。

次に各 CLC-5 construct と VAMP2-pHluorin を共発現させた HEK293 細胞を Leica TCS

SP5 II confocal microscope で観察しエンドゾーム内 pH を測定した。pHluorin は 2 波長励起の pH 感受性 GFP 変異体であり、細胞内小胞膜に発現する蛋白である VAMP2 と結合させた VAMP2-pHluorin は HEK293 細胞のエンドゾーム及び細胞膜上に分布し CLC-5 の発現分布と一致していた。E211A (pH  $6.67 \pm 0.05$ ) と E211Q (pH  $6.67 \pm 0.04$ ) は vector (pH  $6.90 \pm 0.05$ ) と比較して有意にエンドゾーム内を酸性化させたが、wild-type CLC-5 において最大の酸性化を認めた (pH  $6.25 \pm 0.05$ )。また、各 CLC-5 construct 間の細胞内 pH の差異は V-ATPase の阻害剤である bafilomycin 添加により消失した。これらより CLC-5 は V-ATPase の活性化を介してエンドゾーム内を酸性化し、wild-type CLC-5 で最大の酸性化を認めることがわかった。CLC-5 と同様に 2Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送体である CLC-7 を用いた lysosomal pH regulation model でも純粋な Cl<sup>-</sup> チャネルより 2Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送体の方がより強く効率的に酸性化を引き起こすことが示されておりこの結果とよく一致していた。

以上より CLC-5 の 2Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送機能の喪失は Dent 病を引き起こすことが示された。そして、CLC-5 は V-ATPase の活性化を介してエンドゾーム内の酸性化に寄与し、wild-type CLC-5 が V-ATPase の最大機能活性に必要であることが示唆された。